

Zur quantitativen
Bestimmung der Zitronensäure
in Blut und Urin
mittelst Pentabromazetonbildung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von
FRIEDRICH GEY
aus Wyhlen (Deutschland)

VERLAG HANS HUBER
BERN UND STUTTGART

1952

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt
auf Antrag von Professor Dr. K. Bernhard
am 17. November 1952.
Promotion am 22. November 1952.



Alle Rechte vorbehalten
Copyright by Verlag Hans Huber, Bern 1952
In der Schweiz gedruckt — Imprimé en Suisse — Printed in Switzerland
Druck: Walter Fischer Bern

Zur quantitativen Bestimmung der Zitronensäure in Blut und Urin mittelst Pentabromazetonbildung

Von K. F. Gey

Eingegangen am 15. April 1953

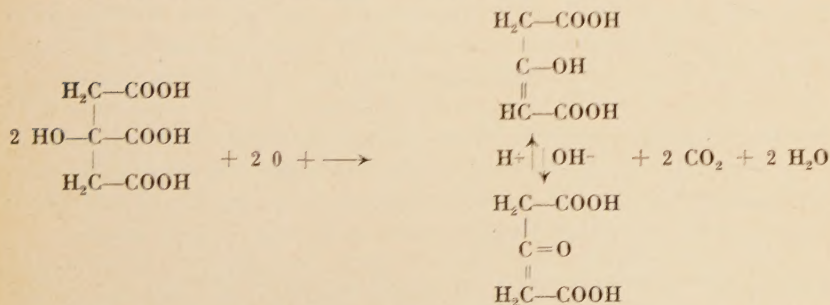
Der exakte quantitative Nachweis der Zitronensäure (Ci) ist eine Forderung vieler praktischer und theoretischer Disziplinen der Medizin. Angesichts der vielen kolorimetrischen Mikromethoden (1–19, 34) lassen sich gewisse Schwierigkeiten bei der Durchführung der Ci-Bestimmung vermuten. Bei unserem eigenen Versuch, Ci in Konzentrationen von 20 bis 200 γ mittels einiger der genannten Methoden zu bestimmen, fanden wir Fehlerbereiche bis zu $\pm 50\%$. Außerdem wurden bei der vorschriftsmäßigen Analyse von Blut und Harn Werte erhalten, die mit denen der Standardkurve nicht in Beziehung gesetzt werden konnten. Auch die Methode, die nach experimentellem Vergleich der meisten anderen Verfahren empfohlen wird (Cartier und Pin 1949 [17]), war nicht überlegen. Wir haben daher die zur Pentabromazeton- (Pba) Bildung empfohlenen Bedingungen nachprüfen und die verschiedenen bisher verwendeten Reagentien vergleichen müssen.

Die verschiedenen auf Pba-Bildung basierenden kolorimetrischen Verfahren haben alle zwei gemeinsame Teile:

Im ersten Teil wird Pba gebildet. Hierzu wird Ci in saurem Milieu durch Oxydationsmittel zu Azetondikarbonsäure decarboxyliert. Diese bildet in Gegenwart von Brom rasch Pba. Nach Untersuchungen von Wiig und Pedersen (20, 21, 22) hat man sich die Reaktion nach dem folgenden Schema vorzustellen.

Reaktionsschema der Pentabromazeton-Bildung

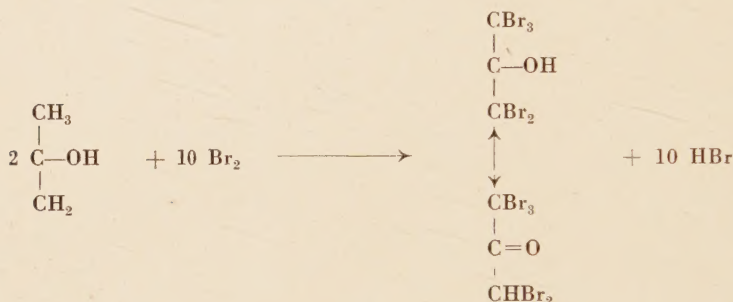
1. Oxydation der Zitronensäure zu Azetondikarbonsäure:



2. Spontane (oder oxydative) Decarboxylierung der Azetondikarbonsäure ausschließlich in Ketoform (Reaktion 1. Ordnung):



3. Bromierung des Azetons in Enolform, die sofort nach der Decarboxylierung der Azetondikarbonsäure entsteht (Reaktion 2. Ordnung):



Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich im ersten Teil sowohl hinsichtlich der Reaktionsbedingungen, als auch der Reagentien. Als Oxydationsmittel dient Permanganat und Vanadat; vom Permanganat wird einerseits ein Überschuß, andererseits vorsichtige Zugabe zur Vermeidung eines Überschusses empfohlen. Die optimale Schwefelsäure-Konzentration der Reaktionslösung ist strittig, es wird 1,5- bis 10-Normalität verwendet. Zur Beseitigung des überschüssigen Broms und Oxydationsmittels nach der Pba-Bildung werden verschiedene Reduktionsmittel und Wasserstoffperoxyd empfohlen. Bei allen Mikromethoden wird anschließend das Pba mit Petroläther oder Heptan extrahiert und dann im zweiten Teil des Bestimmungsganges kolorimetrisch bestimmt.

Im ersten Teil scheint nach unseren Versuchen die größte Schwierigkeit nicht im quantitativen Verlauf der Pba-Bildung zu liegen, sondern in der Entfernung des Oxydationsmittels und Brom nach der Pba-Bildung. Wir fanden, daß hierfür die Verwendung von starken Reduktionsmitteln, z. B. Hydrazin (5, 14, 11, 17), Thio-sulfat (7), Nitrit (10), ungeeignet ist, da dieselben in Gegenwart von Oxydationsmitteln das bereits gebildete Pba in unkontrollierbarem Ausmaß zerstören. Statt dieser Reduktionsmittel scheint nach unseren vergleichenden Versuchen eine verdünnte Wasserstoffperoxydlösung (1) besser geeignet zu sein. Sie führt, unter Einhaltung bestimmter Bedingungen, nicht zum Pba-Verlust.

Den Mechanismus der eigenartigen und bisher unbekannten Zerstörung von Pba durch Reduktionsmittel in Gegenwart von

Oxydantien haben wir nur teilweise untersucht. Es besteht sicher eine starke Abhängigkeit der Pba-Verluste von der Schwefelsäure-Konzentration: wir konnten nachweisen, daß nur dann hohe Schwefelsäure-Konzentrationen zur optimalen Pba-Bildung notwendig zu sein scheinen, wenn starke Reduktionsmittel anschließend verwendet werden. Hingegen fanden wir bei Gebrauch von Wasserstoffperoxyd auch schon bei relativ geringen Schwefelsäure-Konzentrationen eine praktisch quantitative Pba-Bildung aus reinen Ci-Lösungen.

Die von uns beschriebene Zerstörung des Pba erklärt auch die verschiedenen Meinungen über die optimale Konzentration des Oxydationsmittels. Nur bei anschließender Verwendung von Reduktionsmitteln fanden wir einen störenden Einfluß durch das überschüssige Oxydationsmittel. Hingegen erwies sich bei Verwendung von Wasserstoffperoxyd ein Überschuß des Oxydationsmittels zur quantitativen Pba-Bildung geradezu als notwendig.

Eine Fehlerquelle der Ci-Bestimmung stellen nach unseren Untersuchungen auch organische reduzierende Substanzen dar, so z. B. Glukose im Blut. Wir konnten nachweisen, daß bei Steigerung der Glukose-Konzentration, wie sie beim Diabetes mellitus vorkommt, eine scheinbare Verminderung der Ci-Werte festzustellen ist, und zwar um 8—15%. Da sie auch dann auftrat, wenn während der Pba-Bildung immer ein Permanganat-Überschuß herrschte, so sind infolge der wechselnden Quantität der organischen reduzierenden Substanzen verschieden große Fehler möglich und nicht ohne weiteres kontrollierbar.

Weiterhin wurden von uns die übrigen Bedingungen der Pba-Bildung wie Brom-Konzentration, Reaktionstemperatur und -zeit geprüft. Unsere Ergebnisse stehen hier in Einklang mit denen anderer Autoren (13, 17).

Auch die Extraktion des Pba mit Petroläther verschiedener Siedepunkte haben wir geprüft, aber hier keine Schwierigkeit gefunden.

Im zweiten Teil des Bestimmungsganges wird das im Petroläther gelöste Pba mittels verschiedener Verfahren kolorimetrisch bestimmt. Von den beschriebenen vier* Verfahren (1, 13, 14, 23) werden in den Mikromethoden folgende drei am meisten verwendet:

1. Pba wird mittels Natriumsulfid dehalogenisiert und das Brom in wässriger Lösung photometriert (1, 7, 8, 10).
2. Das Brom des Pba wird durch Einwirkung von Jodid stufenweise ersetzt. Das substituierte Jod spaltet sich jedoch wie-

* Nach Abschluß dieser Arbeit wurde uns ein weiteres Verfahren (34) bekannt: die Reaktion von Pba mit alkalischem Pyridin.

der ab und kann als molekulares Jod photometrisch nachgewiesen werden (23, 11, 17), am besten im Petroläther-Alkoholgemisch.

3. Pba bildet mit Thioharnstoff einen Komplex, dessen Farbe in wässriger alkalischer Lösung gelb ist (13).

Wir haben die Extinktionen verglichen, die bei den Absorptionsmaxima der genannten drei Farblösungen meßbar waren. Bei einer Konzentration von $3,47 \cdot 10^{-5}$ Mol Pba in den Farblösungen fand sich die geringste Extinktion beim Brom-Verfahren, die des Thioharnstoff-Pba-Komplexes war 3,5fach höher und die der Jod-Methode 60fach höher, wenn man das Jod im Ultraviolett nachweist. Ein aus anderen Untersuchungen bekanntes Absorptionsmaximum bei $293 \text{ m}\mu$ (24) ist erheblich höher als das bisher allgemein verwendete bei $360 \text{ m}\mu$.

Das Jod-Verfahren ist also zweifellos den anderen an Empfindlichkeit weit überlegen. Es liefert jedoch nur unter strikter Einhaltung gewisser Reaktionsbedingungen reproduzierbare Extinktionen. Durch Standardisierung von H^+ -Ionen-Konzentration, Licht, Temperatur und Zeit lassen sich Streuungen von mehr als $\pm 5\%$ vermeiden. Bei vorschriftsgemäßem Vorgehen nach den bisher beschriebenen Jod-Modifikationen (11, 17) fanden wir bedeutend größere Schwankungen. Dennoch ist das Jod-Verfahren nur für gewisse Zwecke brauchbar, d. h. dann, wenn gleichzeitig keine anderen Substanzen vorkommen, die auch Bromketone bilden, z. B. β -Oxybuttersäure.

Andere Autoren haben weniger große Unterschiede als wir zwischen den Extinktionen des Thioharnstoff-Pba-Komplexes und dem Brom-Verfahren beschrieben (7). Dies scheint hauptsächlich durch die Verwendung von verschiedenen Lichtfiltern bedingt zu sein. Nach unseren Versuchen zeigt z. B. der relativ beste Filter des Spekker-Photometers (Hilger) nur $\frac{1}{5}$ bis $\frac{1}{7}$ der Extinktion des Thioharnstoff-Pba-Komplexes an, die in monochromatischen Licht des Absorptionsmaximums meßbar ist.

Die Bildung des Thioharnstoff-Pba-Komplexes ist dem Brom-Verfahren nicht nur hinsichtlich Empfindlichkeit überlegen, sondern sie ist sogar hinsichtlich Spezifität nach der Literatur (2, 7, 8, 9, 13) die Methode der Wahl. Wir können bestätigen, daß hier gewisse Substanzen nicht interferieren, die bei anderen Verfahren sehr stark stören, z. B. β -Oxybuttersäure. Aber nach unseren Versuchen ist auch die Spezifität des Thioharnstoff-Pba-Komplex nicht gesichert. Durch kurzes Kochen des enteiweißten Blutfiltrates vor der Pba-Bildung vermindert sich die Extinktion um durchschnittlich 10%. Es wird hierdurch also zumindest teilweise eine Substanz zerstört, deren Bromketon mit Thioharnstoff einen Komplex bil-

det. Sein Absorptionsspektrum ist dem des Thioharnstoff-Pba-Komplex ähnlich. Die unbekannte Substanz ist sicher nicht Azetessigsäure; denn der aus Azetessigsäure entstehende Bromketon-Thioharnstoff-Komplex zeigt ein anderes Absorptionsspektrum. Von weiteren β -Ketosäuren wäre an Oxalessigsäure zu denken. Das hieraus entstehende Bromketon bildet zwar mit Thioharnstoff einen Komplex, der auch das gleiche Absorptionsspektrum besitzt wie der Pba-Komplex, aber die Komplexbildung findet hier nur in einem quantitativ zu vernachlässigenden Ausmaß statt. Außerdem konnte in anderen Versuchen keine Oxalessigsäure im menschlichen Blut mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin nachgewiesen werden. Somit bleibt offen, welche interferierende Substanz durch das Kochen ausgeschaltet wird, bzw. wie weit die Thioharnstoff-Extinktion allein auf Ci zurückzuführen ist. Selbstverständlich wurde der Nachweis geführt, daß Ci selbst bei der genannten sauren Verko-
chung nicht zerstört wird.

Für Routine-Untersuchungen ist nach allem das Thioharnstoff-Verfahren am besten geeignet. Wir prüften seine Reproduzierbarkeit: bei einmaliger Extraktion des Pba-haltigen Petroläthers mit der Thioharnstoff-Lösung fanden wir Streuungen von -4% bis $+2\%$. Bei einmaliger Extraktion verläuft die Standardkurve nicht ganz linear. Sie kann jedoch durch wiederholte Extraktion des Petroläthers mit mehreren Portionen Thioharnstoff-Lösung praktisch linear gestaltet werden (18). Der Grund hierfür liegt in der Konzentrationsabhängigkeit der Komplexbildung. Diese wurde auch durch Umkehrung der Extraktionsprozedur bewiesen: durch Ausschütteln einer wässrigen Lösung des Pba-Thioharnstoff-Komplexes mit reinem Petroläther nahm die Menge des kolorimetrisch nachweisbaren Komplexes ab. — Die wiederholte Extraktion ist jedoch weniger empfehlenswert, da wir den Komplex nicht so stabil fanden, wie die Literatur angibt (13): nach unseren Versuchen sollte die Photometrie spätestens 25 Minuten nach Beginn der Komplexbildung erfolgen. In dieser Zeit sollte aber auch die Thioharnstoff-Komplex-Lösung einige Minuten zentrifugiert werden, um Trübungen durch suspendierten Petroläther zu vermeiden.

In biologischen Flüssigkeiten wird Kalzium oft komplex an Ci gebunden (CaCi^-). Die Erfassung der Ci könnte hierdurch behindert sein (25, 26). Wir fanden jedoch nach Kalziumzusatz zu wässrigen Lösungen von Ci oder zu Blut keine Verminderung der Ci-Werte.

Es wurde, unter Berücksichtigung der beschriebenen Ergebnisse, eine Arbeitsvorschrift für Routine-Untersuchungen ausgearbeitet. (Siehe Schluß des experimentellen Teiles.) Sie verwendet zur Pba-Bildung einen Permanganat-Überschuß bei mäßig hoher Schwefel-

säurekonzentration, anschließend Wasserstoffperoxyd zur Entfernung des überschüssigen Permanganates und Broms und basiert auf der Kolorimetrie des Thioharnstoff-Pba-Komplexes. Sie ähnelt somit der Methode von Natelson et al. (13). Bei dem unten beschriebenen Arbeitsgang erhält man bei Verdoppelung und Ver vierfachen der Blut- und Harnmengen Ci-Werte im Verhältnis von 1:2:4 mit einem Fehler von $\pm 5\%$. Die zu Blut und Harn zuge setzten Ci-Mengen werden zu 95 bis 102% zurückgewonnen. Von den vergleichsweise geprüften Mitteln zur Proteinfällung war 10%-ige Trichloressigsäure das geeignetste.

Experimentelles:

A. Kolorimetrie

Zum Vergleich der drei meistgebrauchten Methoden zum kolori metrischen Nachweis des Pba wurde dieses präparativ dargestellt (Bedingungen: 1,5 n H_2SO_4 , 5 n Br_2 , 1,0 n KMnO_4). Es enthält 5 Bromatome (Br erwartet 88,28%, bestimmt 87,94%). Bekannte Mengen des kristallisierten Pba wurden in gereinigtem Petroläther gelöst und gleiche Volumina dieser Lösung einmal mit dem doppel ten Volumen 4%iger Thioharnstoff-, 4%iger Boraxlösung, das an dere Mal mit dem gleichen Volumen 4%iger Natriumsulfidlösung ausgeschüttelt. Die beiden gefärbten Lösungen wurden anschlie ßend zentrifugiert (3 Min. bei 2500 U/Min.), da Petrolätherspuren in den Farblösungen eine bei 650 $\text{m}\mu$ meßbare Trübung verursach ten. Der «Natriumsulfid-Extrakt» wurde vor Belichtung geschützt (7) und beide Lösungen nach 25 Min. gegen entsprechende Leer werte kolorimetriert. Zur Bestimmung der Jodfarbe (23) wurde die gleiche Petrolätherlösung mit gleichem Volumen alkoholischer 3%iger Natriumjodid-Lösung (absolutes Äthanol oder Isopropan- anol) unter Einhaltung unten dargestellter Kautelen gemischt. Alle Ablesungen erfolgten beim Absorptionsmaximum bei 1 cm Schicht- dicke. Es ergab sich

für Natriumsulfid	$E_{455} \text{ m}\mu = 0,040$
für Thioharnstoff	$E_{450} \text{ m}\mu = 0,141$
für die Jodfarbe	$E_{293} \text{ m}\mu = 2,49$ und $E_{358} \text{ m}\mu = 1,68$

$$(E = \log \frac{I_0}{I})$$

Bei der in den Farblösungen vorliegenden Pba-Konzentration von $3,47 \cdot 10^{-5}$ M war also die Extinktion des Thioharnstoff-Pba-Kom- plexes etwa 3,5mal höher als die der entsprechenden Bromlösung

und die der Jodlösung etwa 60mal höher als die der Brom-Extinktion.

Wenn im Petroläther steigende Mengen Pba vorhanden sind und die Extraktion einmal erfolgt, verläuft die Extinktionskurve nicht linear (Fig.1). Hieraus ist eine Konzentrationsabhängigkeit

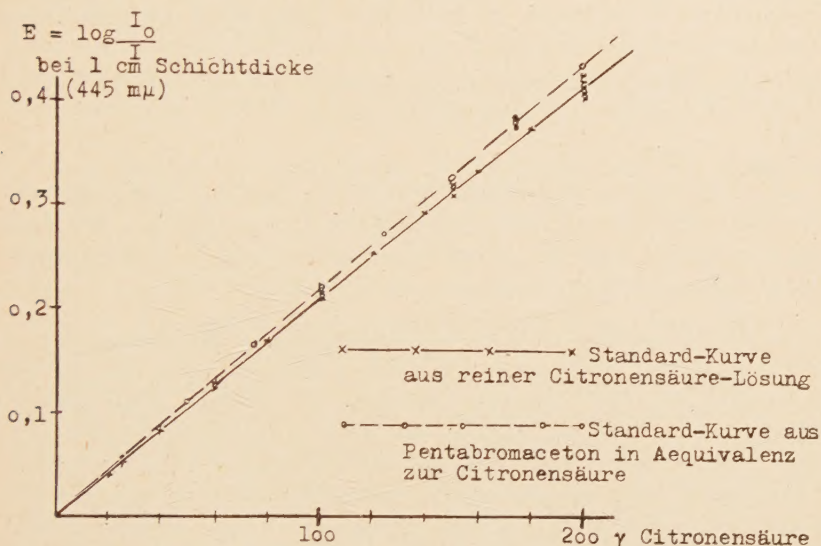


Fig.1 Standard-Kurven aus reinen Citronensäure-Lösungen und äquivalenten Pentabromaceton-Mengen

der Komplexbildung zwischen Pba und Thioharnstoff zu vermuten. Dies bestätigt folgender Versuch: wird von einer Boraxlösung mit Thioharnstoff-Pba-Komplex die eine Hälfte mit 4 Volumina reinem Petroläther ausgeschüttelt, so vermindert sich die Extinktion dieser Farblösung um 11% gegenüber der Kontrolle.

Die Ablesung der Thioharnstoff-Farbe hat nach unseren Versuchen innerhalb 25 Minuten nach Beginn der Ausschüttelung zu erfolgen und nicht erst nach 60 Minuten (13); denn wir fanden nach 35 Minuten schon eine Abnahme der Extinktion um 4%, nach 60 Minuten eine solche um 10%.

Den ungünstigen Einfluß von Filtern gegenüber der Ablesung beim Absorptionsmaximum zeigt der Vergleich der Extinktionen einer Thioharnstoff-Pba-Komplex-Lösung bei gefiltertem und bei monochromatischem Licht (Beckman-Spektrophotometer, bzw. Spekker-Photometer; Schichtdicke 1 cm):

$E_{450 \text{ m}\mu}$	= 0,58	E-Filter OB 1	= 0,09
E-Filter OB 2	= 0,12	E-Filter Wratten Nr. 47	= 0,08

Wenn zum Nachweis des Pba die Jodfarbe benutzt und diese bei 293 m μ photometriert wird, können Mengen von mindestens 0,1 γ Ci bestimmt werden. Die Standardisierung der Jodmethode ergibt sich aus der Prüfung folgender Fehlermöglichkeiten:

a) *Licht*: Wenn der Zusatz der alkoholischen NaJ-Lösung zum Pba-haltigen Petroläther im indirekten Licht einer abgeschirmten Tischlampe erfolgt und das Gemisch bis zur Kolorimetrie vor jeder weiteren Belichtung geschützt wird, sind die Extinktionen praktisch denen gleich, die bei Gebrauch von Rotlicht gemessen werden.

b) *Temperatur und Zeit*: Wir fanden, daß die Reaktion nach Kometiani nach 30 Min. bei 40° C oder nach 120 Min. bei Zimmertemperatur beendet ist, wenn Belichtung und H⁺-Ionenkonzentration standardisiert werden.

c) *H⁺-Ionen*: Die größte Fehlerquelle dieser Methode stellt die Verunreinigung des Reaktionsgemisches durch Säuren dar. Da die Schwefelsäure der wässrigen Lösung, in welcher Pba gebildet wurde, u. U. nicht vollständig aus dem Schütteltrichter entfernt wird, können erhebliche und unkontrollierbare Fehler auftreten. Diese lassen sich mit Sicherheit folgendermaßen vermeiden: der Inhalt des Scheidetrichters wird einmal mit Wasser ausgespült und anschließend mit einem 1 : 4 verdünnten Phosphatpuffer nach Sørensen (pH = 7,0) während 15 Sek. kräftig geschüttelt. Nach exakter Phasentrennung kann anschließend die alkoholische NaJ-Lösung zugesetzt werden. Reste des Phosphatpuffers trüben das Petroläther-Alkohol-Gemisch nicht, vermehren aber in Mengen von 1—5 Tropfen die Extinktion um 0,5—2,5%. Wenn unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse die Farbbildung erfolgt, ist der Fehlerbereich $\pm 5\%$.

Wir selbst gebrauchten bei allen Versuchen mit biologischen Substraten den Thioharnstoff-Borax-Komplex, da hiermit bei Verwendung von 5 cm³ Blutplasma eine ausreichende Extinktion erzielt wird, und zudem diese Farbreaktion den Vorteil höherer Spezifität bietet (s. unten). Wir verkürzten hierbei den Arbeitsgang wiederum durch kurzes Ausschütteln des Scheidetrichter-Inhaltes mit dem erwähnten Phosphatpuffer und anschließend mit Wasser. Der Phosphatpuffer beeinflusst hier die Extinktion nicht, neutralisiert aber sicher alle Säurespuren, die u. U. zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Thioharnstoff-Pba-Komplexes führen können (13). Ein Phosphatpuffer mit höherem pH empfiehlt sich weniger, da wir auch bei nur leicht alkalischem pH eine Unbeständigkeit des Pba feststellten.

B. Extraktion des Pba

Wenn bis zu 300 γ Pba (in 1,0 cm³ Azeton gelöst) zu einer schwefelsauren wässrigen Phase von 15 cm³ zugesetzt und diese mit 8 cm³ Petroläther (Sdp. 80–105° C) während einer Minute kräftig ausgeschüttelt wurde, fanden sich 100% des Pba im Petroläther wieder. Dasselbe war auch der Fall bei Verwendung von tiefer siedendem Petroläther.

C. Entfernung des überschüssigen Broms und Kaliumpermanganates nach Pba-Bildung

Von den hierzu empfohlenen Reduktionsmitteln hat Hydrazin die meiste Verwendung gefunden. Nach dem folgenden Versuch schien es zunächst ohne Einfluß auf Pba zu sein: in einer schwefelsauren Lösung (6 n), in der in Gegenwart von 0,1 n Br₂ und KMnO₄ aus 100 γ Ci Pba gebildet worden war, wurde der Überschuß an Br₂ und KMnO₄ durch tropfenweisen Zusatz von 2 n N₂H₄ · SO₄ (in 0,5 n NaOH) entfernt. Wir fanden 36 bis 68% der erwarteten Extinktion. Diese Quote war annähernd gleich, wenn das Hydrazin schnell und im Überschuß zugesetzt wurde. Die Schwierigkeiten schienen daher — wie dies bereits andere Autoren (27, 28, 7, 17, 4) meinten — bei der Oxydation der Ci zu Azetondikarbonsäure zu liegen. Wir versuchten daher, durch Variierung der Bromkonzentration, der H⁺-Ionenkonzentration und des Redoxpotentials die Verhältnisse zu verbessern. Bei Gebrauch von Hydrazin schien für wässrige Ci-Lösungen die Pba-Ausbeute am größten zu sein, wenn

1. die H₂SO₄-Konzentration 6–10 n betrug (wie dies schon angegeben worden war (5, 11, 14, 17);
2. eine stark verdünnte KMnO₄-Lösung langsam zugetropft wurde, bis der KMnO₄-Überschuß für nur 1/2 Min. bestehen blieb (27, 28, 17).

Unter Berücksichtigung dieser Faktoren konnten wir eine Standardkurve für reine Ci-Lösungen mit einem Fehler von ± 25 bis 40% aufstellen. Wenn jedoch Blut und Urin analysiert wurden, so schwankten die Parallelanalysen um sehr viel weniger; und wenn diesen Substanzen ein entsprechender Ci-Gehalt zugesetzt wurde, waren die neuen Extinktionen vielfach höher als erwartet. Die Extinktionen bei reinen Ci-Lösungen waren somit ohne Beziehung zu denen aus biologischen Flüssigkeiten.

Diese scheinbaren Abhängigkeiten der Pba-Bildung von H⁺-Io-

* Herrn Prof. C. Martius (Physiol.-chem. Institut der Univ. Tübingen) danken wir für seinen freundlichen Hinweis auf dieses Reagens und besonders für seine Unterstützung und Ratschläge bei unserem Besuch in Tübingen.

nenkonzentration usw. verschwinden jedoch überraschenderweise sofort, wenn man Hydrazin-Sulfat durch Wasserstoffperoxyd ersetzt (in 3%iger Lösung). Die Pba-Ausbeute steigt bei Verwendung von H_2O_2 auf 95 bis 100% der erwarteten*.

Durch Vergleich von Wasserstoffperoxyd und Hydrazinsulfat (Tab. 1) wurden unsere anfänglichen Schwierigkeiten als durch Hydrazin bedingte Verluste an schon gebildetem Pba erklärt.

TABELLE 1

100 γ Ci wurden mittels 0,02 m KMnO_4 (d. h. mit deutlichem KMnO_4 -Überschuß) und 0,1 n Br_2 bei wechselnden H^+ -Ionen-Konzentrationen zu Pba umgesetzt und im einen Fall die Lösung anschließend mit 3% H_2O_2 (nach intensiver Kühlung aller beteiligter Lösungen) und im anderen Fall mit 2 n $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{SO}_4$ vorsichtig entfärbt.

H_2SO_4 - Konzentration	Entfärben von überschüssigem Br_2 und KMnO_4 mittels			
	$\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{SO}_4$ E	Pba-Ausbeute	H_2O_2 E	Pba-Ausbeute
1,5 n	0,030	11%	0,216	99,5%
3,0 n	0,035	16%	0,218	100,5%
6,0 n	0,106	49%	0,215	99,0%

Die Tab. 1 zeigt, daß die Abhängigkeit der Pba-Ausbeute von der H^+ -Ionenkonzentration nur vorgetäuscht ist; denn die Schwankungen der Extinktion bei Verwendung von Wasserstoffperoxyd liegen im Fehlerbereich der Methode. Einen erläuternden Beitrag zu der eigenartigen Reaktion liefert der in Tab. 2 zusammengefaßte Versuch, bei dem eine 100 γ Ci äquivalente Pba-Menge (in 1,0 cm^3 Azeton gelöst) zu 14 cm^3 6 n H_2SO_4 zugesetzt wurde, in welcher einmal Brom, einmal KMnO_4 oder schließlich beides vorhanden waren.

TABELLE 2

H_2SO_4	Br_2	KMnO_4	2 n $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{SO}_4$ in 0,5 n NaOH	E	Aufgefunden
6 n	—	—	— Tropfen	0,215 0,214 0,216	$99,0 \pm 0,5\%$
6 n	—	—	2 Tropfen	0,216 0,215	$99,2 \pm 0,3\%$
6 n	—	—	10 Tropfen	0,213 0,215	$98,5 \pm 0,5\%$
6 n	0,6 n	—	4 Tropfen	0,213 0,214	$98,2 \pm 0,3\%$
6 n	0,6 n	0,003 n	6 Tropfen	0,144 0,121 0,136	$64 \pm 8\%$
6 n	—	0,003 n	2 Tropfen	0,144 0,140 0,127	$64 \pm 8\%$
6 n	—	0,003 n	12 Tropfen	0,135 0,120 0,156	$63 \pm 12\%$

Die Extinktionen ergeben, daß Pba offenbar zerstört wird. In anderen, hier nicht wiedergegebenen Versuchen zeigte sich deutlich, daß stets um so weniger Pba zurückgewonnen werden kann, je größer der KMnO_4 -Überschuß ist.

Wir prüften außerdem, ob ein durch Hydrazin bedingter «Schaden» durch H_2O_2 nachträglich wieder ausgeglichen werden kann. Dies war indessen nicht der Fall.

Bei analogen Versuchen mit Vanadat als Oxydationsmittel (7) zeigte dieses das gleiche Verhalten wie Permanganat.

Für die Beurteilung anderer Modifikationen war noch der Vergleich mit anderen empfohlenen Reduktionsmitteln angezeigt. Wir fanden, daß Natriumthiosulfat, Natriumnitrit und -sulfid prinzipiell wie Hydrazin wirken. Eisen-II-Sulfat (1) scheint uns ungeeignet; denn man braucht große Mengen der FeSO_4 -Lösung und kann wegen der Eigenfarbe dieser Lösungen nicht sicher abschätzen, wann genügend zugesetzt wurde; außerdem muß der Petroläther nachträglich mit reichlich Wasser gewaschen werden, um alle Sulfat-spuren zu entfernen, die später bei der Kolorimetrie interferieren könnten (1, 10).

Die Anwendung starker Reduktionsmittel ist somit unzulässig, da sie Pba zerstören können. Die Austreibung von überschüssigem Brom durch Einleiten von Luft oder Stickstoff bewirkte Pba-Verluste von 30—60%. Somit erscheint uns eine verdünnte Wasserstoffperoxydlösung als die relativ beste Möglichkeit zur Entfernung von Br_2 und KMnO_4 — trotz gegenteiliger Mitteilungen (1,6).

TABELLE 3

Die 100 γ äquivalente Pba-Menge wurde in 1,0 cm^3 Aceton zu 14 cm^3 3 n H_2SO_4 zugesetzt, in denen sich im zweiten Fall noch Brom befand. Die zweite Lösung wurde durch tropfenweise Zugabe von 3% H_2O_2 innerhalb 10 Min. entfärbt; Temperatur dabei 3° C.

H_2SO_4	Br_2	3% H_2O_2	E	Aufgefunden in %
3 n	—	—	0,213 0,210	98 97
3 n	0,6 n	4 cm^3	0,217 0,214	100 98,5

Wir überzeugten uns (Tab. 3), daß bei ausreichender Kühlung auf mindestens +3° C keine Pba-Verluste meßbar werden, die den Fehlerbereich der kolorimetrischen Messung überschreiten. Als weitere wichtige Voraussetzung für die vollständige Rückgewinnung des Pba erwies sich noch die langsame und vorsichtige Zugabe von H_2O_2 , die jeden Überschuß vermeidet: bei Zugabe des H_2O_2 in einer Portion konnten nur noch 80—85% des vorher zugesetzten Pba nachgewiesen werden.

Um den Einfluß von organischen reduzierenden Substanzen zu prüfen, fügten wir zu Ci-Lösungen und zu Vollblut Glukose bis zu einer Konzentration von 500 mg% zu. Das enteiweißte Blutfiltrat und die reine Ci-Lösung haben wir danach mit so viel KMnO_4 -Lösung zur Pba-Bildung versetzt, daß ein KMnO_4 -Überschuß gewahrt blieb. Dennoch verminderte sich die Extinktion um 8—14% bei der Analyse von Blut und 15% in Ci-Lösungen (Tab. 4 und 5). Für Urin zeigte sich das gleiche Bild. Nach allem ist zu vermuten, daß bei der Reduktion von KMnO_4 durch Glukose Pba in ähnlicher Weise zerstört wird wie durch die Einwirkung von anorganischen Reduktionsmitteln in Gegenwart von KMnO_4 .

TABELLE 4

100 γ Ci in 6 n H_2SO_4 und 0,01 m Br_2 bei fortwährendem KMnO_4 -Überschuß (0,15 n bzw. 0,4 n) in Pba verwandelt.

Ansätze	E	Absolute Ausbeute in %
100 γ Ci	$0,213 \pm 4,5\%$	98,0
100 γ Ci + Glucose (entspr. 500 mg% Glucose)	$0,184 \pm 2,0\%$	85,0

TABELLE 5

Heparinisiertem Menschenblut wurde nach Proteinfällung Glucose zugesetzt, so daß die Glucose-Konzentration 500 mg% betrug. Pba-Bildung in 3 n H_2SO_4 .

Ansätze	E	mg %	Verminderung der Ci-Konzentration in %
a) 5 cm ³ Blut A	0,098	1,39	14
5 cm ³ Blut A + Glucose	0,085	1,20	
b) 5 cm ³ Blut B	0,089	1,25	8
5 cm ³ Blut B + Glucose	0,082	1,16	
c) 5 cm ³ Blut C	0,089	1,25	12
5 cm ³ Blut C + Glucose	0,078	1,10	

D. Einfluß verschiedener Konzentrationen der Reaktionspartner bei der Pba-Bildung

1. Brom

Wegen der Gefahr der Bildung niederer Bromketone (29) und damit einer Extinktionsverminderung muß fortwährend Bromüberschuß herrschen. Bei Ci-Mengen bis zu 200 γ fanden wir 0,01 n Br_2 als ausreichend. Bei der Analyse biologischer Substrate empfiehlt sich zwecks Halogenisierung der vorhandenen bromaddierenden Substanzen ein der Pba-Bildung vorangehender Zusatz von Bromwasser. Für die Analyse von 5 cm³ Blut genügt etwa 1 cm³ gesättigtes Bromwasser, für 0,2 cm³ Urin 2 cm³.

2. H^+ -Ionenkonzentration.

Aus dem Vergleich der Wirkungen von H_2O_2 und den Reduktionsmitteln ergab sich, daß die starke Abhängigkeit der Pba-Ausbeute von der H^+ -Ionenkonzentration nur vorgetäuscht wird und in Übereinstimmung mit anderen Autoren (1, 13, 19) bei Konzentrationen von 1,5 bis 6,0 n H_2SO_4 keine signifikanten Unterschiede in der Pba-Ausbeute festzustellen sind.

Auch das Vollblut von Mensch und Kaninchen zeigte nach eigenen Versuchen keine signifikanten Extinktionsunterschiede bei diesen Mineralsäurekonzentrationen.

3. Kaliumpermanganat.

Der wichtigste Faktor bei der Pba-Bildung scheint die $KMnO_4$ -Konzentration zu sein. Ohne $KMnO_4$ -Überschuß (Tab. 6, a) sinkt die Extinktion auf etwa $\frac{1}{5}$ des optimalen Wertes. Bei geringem $KMnO_4$ -Überschuß beträgt sie noch 95% (Tab. 6, b, c). Ein selbst trächtlicher Überschuß schadet nichts (Tab. 6, e).

TABELLE 6

100 γ Ci mit verschiedenen Mengen $KMnO_4$ in 3 n H_2SO_4 und 0,01 m Br_2 behandelt; vorsichtiges und langsames Entfärben mit 3% H_2O_2 ; Kolorimetrie mit Thioharnstoff innerhalb 25 Min.

	$KMnO_4$	E	Pba-Ausbeute in %
a	0,042 m	0,048	22
b	0,048 m	0,203	94
c	0,125 m	0,207	96
d	0,168 m	0,217	100,5
e	0,250 m	0,214	99

Aus Tab. 6 resultiert die praktische Forderung des beständigen $KMnO_4$ -Überschusses (1, 3, 6, 8), der durch seine violette Farbe gut neben dem braunen MnO_2 erkennbar ist*.

4. Temperatur und Zeit.

Eine deutliche Abhängigkeit der Pba-Ausbeute von der Reaktionstemperatur konnten wir zwischen 5 und 40° C nicht feststellen; die Schwankungen lagen im Fehlerbereich der kolorimetrischen Methode ($\pm 4\%$). Wir stimmen in dieser Ansicht mit anderen Autoren (30) überein.

* Erst nach Drucklegung dieser Arbeit wurde uns eine neuere Methode (33) bekannt, nach welcher durch Metaphosphorsäure-Zusatz eine MnO_2 -Präzipitation verhütet und eine strenge Kontrolle der Pba-Bildung überflüssig werden soll. Nach unseren Ergebnissen ist dies aber zumindest teilweise dem von diesen Autoren gleichfalls benutzten H_2O_2 zu verdanken.

Die in der Literatur beschriebenen Beeinflussungen durch den Zeitfaktor konnten wir bestätigen. Nach 15 Minuten war nur noch eine unmerkliche, nicht mehr signifikante Erhöhung der Extinktion meßbar. Aus Sicherheitsgründen wurde die Reaktionszeit 30 Minuten gewählt.

F. Ci-Konzentration

Alle bisherigen Ergebnisse gelten für einen Bereich von 25 bis 200 γ Ci, d. h. in etwa 9 bis $66 \cdot 10^{-6}$ molarer Ci-Lösung.

Bei geringeren Konzentrationen, nämlich bei 0,1 bis 1,0 γ Ci (in etwa 0,5 bis $5 \cdot 10^{-7}$ molarer Lösung) scheinen die Verhältnisse komplizierter zu werden. Hier traten, unter Verwendung der Komietiani-Reaktion und Beachtung der oben genannten Kautelen, bei reinen Ci-Lösungen Schwankungen der Parallelwerte von $\pm 20\%$ auf.

G. Einfluß der Enteiweißung

Zur Enteiweißung proteinhaltiger, organischer Flüssigkeiten sind drei Substanzen empfohlen worden: Trichloressigsäure (1), welche die häufigste Verwendung gefunden zu haben scheint; Metaphosphorsäure (8) und Wolframsäure (7). Wir fanden Wolframsäure wenig geeignet (25% Verluste), Trichloressigsäure und Metaphosphorsäure annähernd gleichwertig, geben aber der Trichloressigsäure wegen ihrer bequemerem Handhabung den Vorzug.

Wir verhinderten die Blutgerinnung durch Zugabe von 3 Tropfen 4%igem Heparin zu 5 cm³ Blut. 2 cm³ des 4%igen Heparins geben, nach der unten beschriebenen Methode behandelt, keine meßbare Extinktion.

Früher wurde gezeigt (31, 32), daß Erythrozyten keine Ci enthalten. Wegen der Forderung sofortiger Enteiweißung (1) des Blutes, haben wir die Ci-Rückgewinnung aus Vollblut geprüft: wir konnten 97,5—101% wiederfinden. Daher darf Vollblut statt Plasma verwendet werden, wenn sich die Erythrozytenkonzentration im Blut nicht ändert. Wir fanden bei Befolgung der unten angegebenen Analysevorschrift bei 12 gesunden Personen 1,16 mg% $\pm 22\%$ im Vollblut. Dieser Wert liegt etwa 40% unter dem anderer Autoren (12), die Plasma oder Serum analysierten; die Differenz entspricht ziemlich genau dem Volumen der Erythrozyten im Vollblut.

H. Störungen durch andere Substanzen

Die Spezifität der einzelnen Methoden wird hauptsächlich durch die Art der kolorimetrischen Reaktion bestimmt. Bei der Dehalo-

genisierung des Pba mittels Na_2S interferieren u. a. (2, 7, 8) hauptsächlich β -Oxybuttersäure, Asparaginsäure und Aspartinsäure (1, 10), selbst wenn das enteiweißte Blutfiltrat nach Mineralsäure-zusatz gekocht wird. Bei der Jodreaktion sind die Verhältnisse vermutlich ähnlich (11, 17), d. h. β -Oxybuttersäure scheint auch hier die wichtigste der interferierenden Substanzen zu sein.

Der Thioharnstoff-Pba-Komplex hingegen soll nicht mit β -Oxybuttersäure interferieren (13). Wir bestätigen, daß die Extinktion des Thioharnstoff-Pba-Komplexes durch pathologisch gesteigerte Konzentrationen von β -Oxybuttersäure und auch durch Azeton und Brenztraubensäure nicht beeinflußt wird, selbst wenn man die betreffende Lösung nicht vor der Pba-Bildung sieden läßt.

Azetessigsäure kann durch Kochen des angesäuerten enteiweißten Filtrates leicht ausgeschaltet werden; aber auch ohne dieses ist die Störung nicht groß. Erst 10 mg azetessigsäures Natrium täuschen 20 % Ci vor, da das aus Azetessigsäure entstehende Bromketon nur in geringem Maße mit Thioharnstoff einen Komplex bildet und dieser ein vom Thioharnstoff-Pba-Komplex verschiedenes Absorptionsspektrum besitzt. Dieses zeigt bei 405 $\text{m}\mu$ ein Maximum und steigt erst unterhalb 360 $\text{m}\mu$ steil an.

Nun verringert sich aber durch Siedenlassen des enteiweißten Blut-Filtrates nach Zusatz der Schwefelsäure die Extinktion regelmäßig um 8—15% (Tab. 7 A). Da reine Ci in 3 n H_2SO_4 keine Verluste erleidet (Tab. 7 B) und auch die zum enteiweißten Filtrat von Vollblut zugesetzte Ci nach dem Sieden vollständig wiedergefunden wird (Tab. 7 A, II, IV), muß angenommen werden, daß durch die Erhitzung des angesäuerten Filtrates ein Bestandteil zerstört wird, welcher die Extinktion um etwa 10% erhöht.

TABELLE 7 A

I. Enteiweißtes Filtrat 10 Min. bei 100° C in 3 n H_2SO_4		II. Enteiweißtes Filtrat nicht erhitzt		II—I %
Patient	mg % Ci	Patient	mg % Ci	
a	1,06	a	1,25	15
b	1,02	b	1,16	13
c	1,20	c	1,39	13
d	1,16	d	1,25	8
III. Enteiweißtes Filtrat + 50% Ci (entsprechend zusätzlichen 1,5 mg% Ci), 10 Min. bei 100° C in 3 n H_2SO_4		IV. Enteiweißtes Filtrat + 50% Ci (entsprechend zusätzlichen 1,5 mg% Ci), nicht erhitzt		
a	2,55	a	2,74	
c	2,70	c	2,88	

TABELLE 7 B

V. 100 γ Ci in 20 cm ³ 3 n H ₂ SO ₄ . 10 Min. bei 100° C.	VI. 100 γ Ci in 20 cm ³ 3 n H ₂ SO ₄ nicht erhitzt	VI-V %
E entsprechend 99 γ Ci	E entsprechend 100 γ Ci	1
VII. 100 γ Ci in 20 cm ³ CCl ₃ COOH und 3 n H ₂ SO ₄ 10 Min. bei 100° C.	VIII. 100 γ Ci in 20 cm ³ CCl ₃ COOH und 3 n H ₂ SO ₄ nicht erhitzt	VIII-VII %
E entsprechend 100 γ Ci	E entsprechend 99 γ Ci	—1

Das Absorptionsspektrum des Thioharnstoff-Komplexes, das ohne Erhitzen des Blutfiltrates entsteht, unterscheidet sich von dem nach dem Sieden aber nur durch eine höhere Extinktion: beide Kurven sind verhältnismäßig und haben ihr Maximum bei 450 m μ und ihr Minimum bei 370 m μ . Somit kann die interferierende Substanz nicht Azetessigsäure sein, da das hieraus entstehende Bromketon einen bei 405 m μ maximal absorbierenden Komplex mit Thioharnstoff bildet. — Wir prüften noch eine mögliche Störung von Oxalessigsäure: das Absorptionsmaximum lag bei 450 m μ , das Minimum bei 370 m μ . 50 mg Oxalessigsäure täuschen jedoch nur 40 γ Ci vor. Da außerdem in anderen Versuchen mittels papierchromatographischer Trennung von 2.4-Dinitrophenylhydrazonen des menschlichen Blutes keine Oxalessigsäure nachweisbar war, dürfte die durch Erhitzen zumindest teilweise zerstörbare Substanz nicht Oxalessigsäure sein.

Tab. 8 zeigt, daß vermehrte Kalziumkonzentration in saurem Milieu die Ci-Werte nicht beeinflußt.

TABELLE 8

Versuch	Ansätze	Zugabe von mg CaCl ₂	E
a	100 γ Ci in 3 n H ₂ SO ₄ nach der	—	0,213
b	unten gegebenen Vorschrift ver-	0,5	0,220
c	arbeitet	5,0	0,211
d	3,3 cm ³ enteiweißtes Filtrat von	—	0,098
e	menschlichem Vollblut	5,0	0,099

Arbeitsvorschrift für die Bestimmung von 25 – 200 γ Zitronensäure

Blutplasma:

Etwa 7 cm³ Vollblut werden sofort nach der Blutentnahme mit 3 Tropfen 4%iger Heparin-Lösung versetzt, auf 20° C abgekühlt und 5 Min. bei etwa 2500 U/Min. zentrifugiert. Zu 3,0 cm³ des überstehenden Plasmas werden in einem Erlenmeyerkolben von 50 cm³

unter fortwährendem Schütteln 15 cm^3 10%iger Trichloressigsäure zugegeben. Nach 10 Min. filtriert man durch ein hartes Filterpapier, gibt $15,0\text{ cm}^3$ des enteiweißten Filtrates in einen Rundkolben von etwa 100 cm^3 und fügt 2 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure hinzu. (Diese Lösung kann einige Stunden bei Zimmertemperatur stehenbleiben, wenn dies aus äußeren Gründen notwendig sein sollte.) Das angesäuerte enteiweißte Filtrat wird während 10 Min. in ein kochendes Wasserbad gebracht, wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit etwa 1 cm^3 gesättigtem Bromwasser versetzt. Falls die gelbe Bromfarbe innerhalb 5 Min. verschwindet, muß weiter Brom zugesetzt werden bis sie erhalten bleibt. 5 Min. nach Zusatz des Bromwassers werden 1 cm^3 1 n Kaliumbromid-Lösung und, unter Schütteln des Kolbens, 4 cm^3 1,5 n Kaliumpermanganat-Lösung zupipettiert. Der am violetten Farbton erkennbare Überschuß an Kaliumpermanganat muß während der folgenden 30 Min. (eventuell durch weiteren Zusatz) aufrechterhalten bleiben. Nach 30 Min. Reaktionszeit bei Zimmertemperatur wird der Kolben in Eiswasser gestellt. Erst wenn die Abkühlung auf $1\text{--}2^\circ\text{C}$ erfolgt ist, wird der Überschuß an Brom, Permanganat und Braunstein durch Zugabe 3%iger ebenfalls gekühlter Wasserstoffperoxyd-Lösung entfernt. Diese muß sehr vorsichtig portionenweise in Abständen von mindestens 30 Sek. und unter steter Kühlung erfolgen, da ein Überschuß an Wasserstoffperoxyd erhebliche Mengen Pentabromazon zerstören kann! Die Entfernung erfordert beim Vorhandensein von viel Brom etwa eine halbe Stunde. Die vollständig farblose Lösung wird sodann in einen Scheidetrichter von etwa 50 cm^3 Volumen gebracht, der Kolben zweimal mit wenig Wasser und anschließend mit 15 cm^3 kaltem Petroläther ($1\text{--}2^\circ\text{C}$) ausgespült. Mit diesem Petroläther wird danach die wässrige Phase während 1 Min. im Scheidetrichter kräftig geschüttelt. Nach vollständiger Trennung wird die wässrige Phase abgelassen und die Petrolätherphase mit etwa 10 cm^3 Wasser und anschließend mit 10 cm^3 Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7,0$) durch kräftiges Schütteln während 30 Sek. ausgewaschen. Der Stopfen des Scheidetrichters soll dabei jeweils mit einigen Tropfen Petroläther abgespült werden. Nachdem die Abtrennung der letzten wässrigen Phase besonders sauber erfolgt ist, werden $10,0\text{ cm}^3$ 4%ige Thioharnstoff- und 4%ige Borax-Lösung in den Scheidetrichter gegeben und der Petroläther während 5 Min. kräftig mit dieser Lösung geschüttelt. Der größte Teil der nun gelb gefärbten wässrigen Phase ist am besten mittels einer Kapillare oder Pipette in ein Zentrifugenglas zu überführen. Nach 3minutigem Zentrifugieren bei 2500 U/Min. kann gegen einen entsprechenden Leerwert (4%ige Thioharnstoff- und 4%ige Borax-Lösung) bei 450 $m\mu$ kolorimetriert werden. Zwischen

der letzten Extraktion und der Kolorimetrie dürfen nicht mehr als 25 Min. verstreichen. Zur Photometrie verwende man nach Möglichkeit Küvetten mit mindestens 2 cm Schichtdicke. Für jede Serie soll ein Standardwert von 50 oder 100 γ Ci gemessen werden, um mögliche Fehler zu erfassen (ungenügender Kaliumpermanganat-Überschuß, Verluste durch überschüssiges Wasserstoffperoxyd, bzw. mangelnde Kühlung beim Wasserstoffperoxyd-Zusatz).

Vollblut:

Wenn Vollblut an Stelle von Blutplasma gebraucht werden kann (unveränderte Hämatokritwerte), genügen 5,0 cm³ hepariniertes Blut. Diese werden mittels 25,0 cm³ 10%iger Trichloressigsäure enteiweißt. 20 cm³ des Filtrates sind in einen Erlenmeyerkolben überzuführen, mit 2,4 cm³ konzentrierter Schwefelsäure zu versetzen und nach den obigen Angaben zu verarbeiten.

Urin:

Man verdünne den Urin mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 10 und versetze 2 cm³ mit 3,0 cm³ konzentrierter Schwefelsäure, koche 10 Min. im Wasserbad und setze nach Abkühlung der Lösung 2 cm³ Bromwasser zu. Der Bromüberschuß soll bestehen bleiben. Anschließender Zusatz von 1 cm³ Kaliumbromid und 8 cm³ Kaliumpermanganat-Lösung (eventuell mehr, bis der violette Farbton bestehen bleibt). Alles weitere wie beim Blut. Eiweißhaltiger Urin wird mit 10%iger Trichloessigsäure und dest. Wasser versetzt, so daß die Verdünnung 1 : 10 gewahrt bleibt. Vom Filtrat werden wiederum 2,0 cm³ verwendet.

Standard-Kurve:

100 mg wasserfreie Ci oder 109.8 mg Ci mit 1 Mol Kristallwasser werden auf einer Analysenwaage eingewogen, in 100 cm³ 0.1 n Schwefelsäure gelöst und 10.0 cm³ dieser Lösung mit 0.1 n Schwefelsäure auf 1000 cm³ aufgefüllt. 1 cm³ dieser Lösung enthält 10 γ Ci. Je 2, 4, 6 ... bis zu 20 cm³ dieser Lösung werden mit Wasser auf ein Volumen von 20 cm³ aufgefüllt, dann 2.4 cm³ konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt und entsprechend den Angaben für enteiweißtes Blutfiltrat weiterverarbeitet. Da die Standardkurve nicht linear verläuft, sollten die Fixpunkte nicht weiter als 20 γ auseinanderliegen. — Die Ci-Lösungen sind in 0,1 n Schwefelsäure mindestens zwei Jahre beständig.

Berechnung der Ci-Menge:

Der Vergleich von gemessenen Extinktionen mit den Standardwerten setzt voraus, daß stets 15 cm³ Petroläther mit je 10 cm³

Thioharnstoff-Borax-Lösung während 5 Min. einheitlich extrahiert werden.

Die auf der Standardkurve abgelesenen Ci-Werte in Milligramm werden folgendermaßen auf 100 cm³ umgerechnet:

a) *Plasma: Gefundener Wert* $x \cdot 40$

Da von 3,0 cm³ Blutplasma 15/18 verarbeitet werden, finden sich in 100 cm³: $x \cdot \frac{18 \cdot 100}{15 \cdot 3} = 40.$

b) *Vollblut: Gefundener Wert* $x \cdot 30$

Da von 5 cm³ Vollblut 20/30 verarbeitet werden, muß sich in 100 cm³ Vollblut finden: $x \cdot \frac{30 \cdot 100}{20 \cdot 5} = 30.$

c) *Urin*: Bei der Verarbeitung von Urin gibt der gemessene Wert die Ci-Menge von 0,2 cm³ Urin an. Die Ci-Menge des Tagesurins ergibt sich durch Multiplikation des gemessenen Wertes mit 5 und der Anzahl Kubikzentimeter der Tagesurinmenge.

Reagentien

10%ige Trichloressigsäure (CCl₃COOH): 100 g analysenreine Trichloressigsäure werden in 900 cm³ dest. Wasser gelöst.

Konzentrierte Schwefelsäure pro analysi, 95—97%ig.

0,1 normale Schwefelsäure: 2,8 cm³ konz. Schwefelsäure p. a. in 1000 cm³ dest. Wasser.

Gesättigtes Bromwasser: 5 g Brom Ph. H. V. sind mit 100 cm³ dest. Wasser zu schütteln.

1 n Kaliumbromid-Lösung (KBr): 11,9 g analysenreinen Kaliumbromides werden in 100 cm³ dest. Wasser gelöst.

1,5 n Kaliumpermanganat (KMnO₄): 47,4 g werden in dest. Wasser gelöst und auf 1000 cm³ gebracht.

3%iges Wasserstoffperoxyd: 30%ige H₂O₂-Lösung p. a. mit dem 9fachen Volumen dest. Wasser verdünnen.

Petroläther (Sdp. 80—105° C.): Petroläther ist mit $\frac{1}{10}$ seines Volumens an 50%iger H₂SO₄ mehrfach kräftig auszuschütteln und anschließend mit $\frac{1}{10}$ seines Volumens an 4,5%iger KMnO₄-Lösung in 10%iger H₂SO₄. Diese zwei Prozeduren sind so oft zu wiederholen, bis 50% H₂SO₄ beim Ausschütteln mit Petroläther-Proben farblos bleibt. Darauf wird der Petroläther über Calciumchlorid getrocknet und destilliert.

Phosphat-Puffer, pH = 7,0 (nach Sörensen): 11,88 g sek. Natriumphosphat «n. Sör.» (Na₂HPO₄ + 2 H₂O) werden in 1000 cm³ dest. Wasser gelöst, desgleichen 9,09 g prim. Kaliumphosphat «n. Sör.» (KH₂PO₄) in 1000 cm³ dest. Wasser. 78,0 cm³ der Kaliumphosphat-Lösung werden mit 122,0 cm³ der Natriumphosphat-Lösung gemischt und 600 cm³ dest. Wasser hinzugefügt.

Thioharnstoff-Borax-Lösung: 40,0 g krist. Natriumtetraborat (Na₂B₄O₇ + 10 H₂O) p. a. werden in 1000 cm³ dest. Wasser gelöst. In 200 cm³ dieser 4%igen Borax-Lösung sind 8,0 g Thioharnstoff (H₂N—CS—NH₂) zu lösen. Die Thioharnstoff-Lösung sollte möglichst oft frisch angesetzt werden, mindestens wöchentlich.

Zusammenfassung

1. Die vorliegende Arbeit bezweckte eine kritische Überprüfung der kolorimetrischen Zitronensäure-Bestimmungsmethoden, die auf der Bildung von Pentabromazeton basieren.

2. Wir verglichen die zur Pentabromazetonbildung empfohlenen Reaktionsbedingungen und fanden als Ursache vieler Unstimmigkeiten hinsichtlich der optimalen Reaktionsbedingungen, daß starke Reduktionsmittel (Hydrazin, Nitrit, Natriumsulfit) in Gegenwart von Permanganat oder Vanadat einen Teil des Pentabromazetons zerstören, und daß diese Pentabromazetonverluste von der Mineralsäurekonzentration abhängig sind.

3. An Stelle der genannten Reduktionsmittel dient zur Entfernung des überschüssigen Broms und Permanganats nach der Pentabromazetonbildung besser verdünntes Wasserstoffperoxyd.

4. Zur Verminderung der Pentabromazetonausbeute führen auch organische reduzierende Substanzen, z. B. Glukose.

5. Die Methoden zum kolorimetrischen Nachweis des Pentabromazetons wurden verglichen und das Jodverfahren nach Kometiani den anderen an Empfindlichkeit überlegen festgestellt. Bei wechselnden Versuchsbedingungen ist dank höherer Spezifität das Thioharnstoffverfahren nach Natelson et al. zu empfehlen. Auch bei dieser Reaktion sind jedoch mindestens 10% der Extinktion des Vollblutes nicht auf Zitronensäure zurückführbar, wenn das entweißte Blutfiltrat nicht für kurze Zeit erhitzt wird. Die interferierende Substanz besitzt ein ähnliches Absorptionsspektrum wie der Thioharnstoff-Pentabromazeton-Komplex, ist jedoch nicht Azetessigsäure und wahrscheinlich nicht Oxalessigsäure.

6. Aus allen Untersuchungen resultiert eine Arbeitsvorschrift für Routine-Untersuchungen zum quantitativen Nachweis der Zitronensäure bei Konzentrationen von 25 bis 200 γ . Der Fehlerbereich für reine Zitronensäurelösungen liegt hierbei um $\pm 4\%$.

CONCLUSION

Sur le dosage quantitatif de l'acide citrique dans le sang et l'urine avec Pentabromacétone. Par K. F. Gey.

L'auteur décrit une méthode avec laquelle il est possible de déceler l'acide citrique dans les quantités de 25 à 200 γ avec une erreur moyenne de 4%.

SUMMARY

Determination of Citric Acid in Blood and Urine by formation of Pentabromacetone. By K. F. Gey.

Description of a method for determining 25 to 500 μg of citric acid with an error of $\pm 4\%$.

LITERATUR

1. Pucher G. W., C. C. Sherman, H. B. Vickery: J. biol. Chem. 1936, 113, 235. — 2. Breusch F. L.: Z. physiol. Chem. 1937, 250, 262. — 3. Deysher E. F.,

- G. E. Holm: Ind. and Eng. Chem., Anal. 1942, 4, 4. — 4. Purington H. J., C. Schuck: J. biol. Chem. 1943, 148, 237. — 5. Goldberg A. S., A. R. Bernheim: J. biol. Chem. 1944, 156, 33. — 6. Perlman D., H. H. Lardy, M. J. Johnson: Ind. and Eng. Chem., Anal. 1944, 16, 515. — 7. Weil-Malherbe H., A. D. Bone: Biochem. J. 1949, 45, 377. — 8. Krebs H. A., L. V. Eggleston: Biochem. J. 1944, 38, 426. — 9. Josephson B., U. Forssberg: J. Lab. and Clin. Med. 1941, 27, 267. — 10. Hunter F. E., L. F. Leloir: J. biol. Chem. 1945, 159, 295. — 11. Taussky H. H., E. Shorr: J. biol. Chem. 1947, 169, 103. — 12. Natelson S., J. K. Lugovoy, J. B. Pincus: J. biol. Chem. 1947, 170, 597. — 13. Natelson S., J. B. Pincus, J. K. Lugovoy: J. biol. Chem. 1948, 175, 745. — 14. Wolcott G. H., P. D. Boyer: J. biol. Chem. 1948, 172, 729. — 15. Saffran M., O. F. Denstedt: J. biol. Chem. 1948, 175, 849. — 16. Haven L. F., C. Randall: J. biol. Chem. 1948, 175, 737. — 17. Cartier P., P. Pin: Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 1176. — 18. Martius C.: unveröffentlicht 1951. — 19. Miller H., C. Carruthers: Canc. Res. 1950, 10, 636. — 19. Miller H., C. Carruthers: Canc. Res. 1950, 10, 636. — 20. Wüig E. O.: Journ. physikal. Chem. 1928, 32, 961. — 21. Pedersen K. J.: J. Am. Chem. Soc. 1929, 51, 2098. — 22. Derselbe: 1936, 58, 240. — 23. Kometiani P. A.: Z. anal. Chemie 1931, 86, 359. — 24. Grant M. J.: Trans. Faraday Soc. 1935, 31, 433. — 25. Delage B.: Compt. rend. 1947, 225, 1187. — 26. Hennig W., N. G. Schmahl, W. Theopold: Biochem. Z. 1950, 321, 401. — 27. Bartels W.: Z. f. Unters. d. Lebensm. 1933, 65, 1. — 28. Pfab H.: Die Bestimmung der Ci im Wein, Dissert. 1931. Dresden. — 29. Lederer L.: DRP 95440, DRP 98009. — 30. Pucher G. W., H. B. Vickery, C. S. Leavenworth: Ind. and Eng. Chem., Anal. 1934, 6, 190. — 31. Nordbö R., B. Schersten: Scand. Arch. Physiol. 1931, 63, 124. — 32. Gathe R., K. K. Nygaard: Scand. Arch. Physiol. 1940, 83, 199. — 33. Hargraeves C. A. II, M. D. Abrahams, H. B. Vickery: Anal. Chem. 1951, 23, 467. — 34. Ettinger R. H., L. R. Goldbaum, L. H. Smith, jr.: J. biol. Chem. 1952, 199, 531.

Vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe der «Roche»-Studien-Stiftung durchgeführt. Herrn P.-D. Dr. S. Markees danke ich für die Zuweisung des Themas und seine persönliche Förderung, Herrn Dr. M. Kofler für seine vielfältige Unterstützung.
